

УДК 576.895.122.1

СЕРОТОНИН И ДОФАМИН В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ТКАНЕЙ *POLYSTOMA INTEGERRIMUM* (MONOGENEA)

Н. Б. Теренина, Е. Б. Оверчук

В результате спектрофлуориметрического анализа в экстрактах тканей *Polystoma integerrimum* выявлены вещества со спектральными характеристиками, идентичными серотонину и дофамину.

Ряд имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что биогенные амины — катехоламины и серотонин — являются вероятными медиаторами нервной системы гельминтов. В нервной системе нематод, trematod и цестод с помощью гистофлуоресцентных методов выявлены аминергические элементы. Анализ экстрактов тканей паразитов обнаружил наличие в них катехоламинов и серотонина. В то же время класс моногеней остается в этом отношении не изученным. Немногочисленные гистохимические и электронно-микроскопические данные показывают, что элементы нервной системы моногеней *Gastrocotyle trachuri* и *Polystoma integerrimum* содержат биогенные амины (Шишов и др., 1982; Shaw, 1982).

Задачей нашего исследования явилось определение дофамина и серотонина в гомогенатах тканей моногеней *P. integerrimum* — паразита мочевого пузыря лягушки *Rana temporaria*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работу проводили на свежих и замороженных (-20°) гельминтах. При спектрофлуориметрической идентификации дофамина использовали модифицированный (Манухин и др., 1975) триоксииндоловый метод Карлссена и Вальдека (Carlsson, Waldeck, 1958). Размер навески тканей составлял 0.2—0.8 г (18—180 экз. гельминтов). Ткань гомогенизировали в 0.2 M хлорной кислоте с 0.5 %-ной ЭДТА, спустя 30 мин центрифугировали, затем, доведя pH экстракта до 6.5, пропускали через колонку с ионообменной смолой Дауэкс-50. Элюцию осуществляли 2 M хлорной кислотой, окисление — 0.02 M раствором иода.

При определении серотонина был применен модифицированный метод Юден-френда (1965). Ткань (0.6—2.0 г; 60—300 экз. гельминтов) гомогенизировали в 0.1 н соляной кислоте, встряхивали с n-бутанолом, NaCl и боратным буфером, центрифугировали. Бутанольную фазу промывали равным объемом боратного буфера, а затем после встряхивания с гептаном и 0.1 н HCl отделяли водную фазу, содержащую серотонин. Наряду с указанным методом использовали модифицированный (Узбеков, 1981) метод Майкеля и др. (Majckel e. a., 1968). Определения выполнены на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi MPF-4.

Максимумы спектров возбуждения и флуоресценций для дофамина были расположены при 323 и 368—372 нм. Соответствующие максимумы спектров

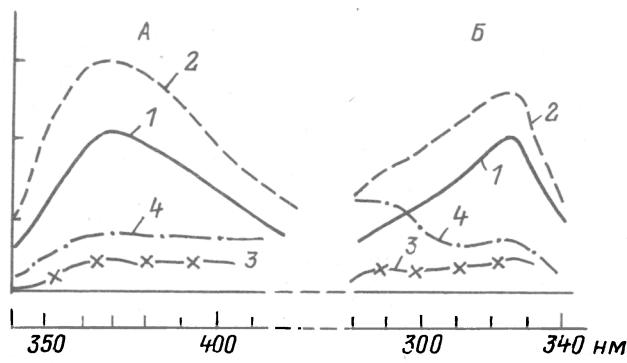


Рис. 1. Спектры флуоресценции (A) и возбуждения (Б) дофамина.
1 — 0.1 мкг и экстракта тканей полистом (2). Контроль: 3 — к стандарту; 4 — к экстракту тканей полистом.

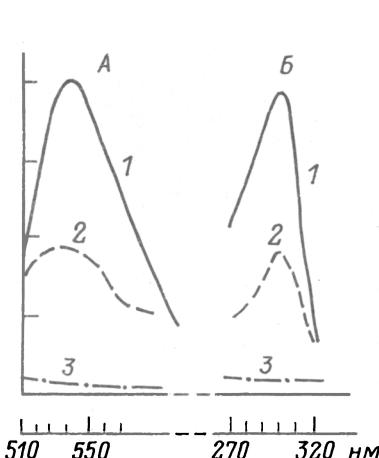


Рис. 2. Спектры флуоресценции (A) и возбуждения (Б) серотонина.
1 — 0.333 мкг и экстракта тканей полистом (2). Контроль: 3 (метод Юденфранда, 1965)

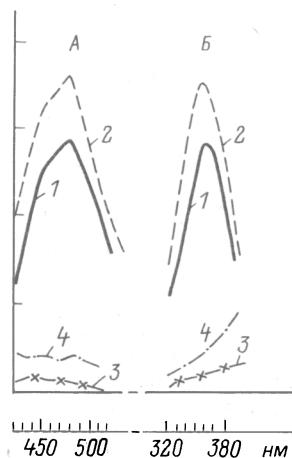


Рис. 3. Спектры флуоресценции (A) и возбуждения (Б) серотонина.
1 — 0.666 мкг и экстракта тканей полистомы (2). Контроль: 3 — к стандарту; 4 — к экстракту тканей полистом (метод Maickel et al., 1968).

серотонина в 3 н HCl находились при 295 и 535—540 нм, а продукта конденсации серотонина с ортофталевым альдегидом при 355 и 480 нм.

В качестве стандартных растворов использовали дофамин (3-hydroxytygamine HCl, Koch-Light), серотонин—креатинин сернокислый (Reanal).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные эксперименты показали, что в гомогенатах тканей полистом присутствует вещество со спектральными характеристиками, идентичными таковым стандартного раствора дофамина (рис. 1). Количество вещества составляет 0.25—0.65 мкг/г сырого веса тканей, что соответствует наличию 0.7—8.7 нг дофамина в одном паразите (табл. 1). Определение дофамина в передних и задних фрагментах тела не выявило различий в концентрации вещества в разных частях тела гельминтов (табл. 2).

При идентификации серотонина в тканях полистом получены следующие результаты. Спектры флуоресценции и возбуждения тканевых экстрактов

Таблица 1
Содержание дофамина
в экстрактах тканей
P. integerrimum

мкг/г сырого веса тканей	нг на 1 паразита
0.333	1.3
0.462	2.2
0.650	8.7
0.344	3.5
0.540	3.2
0.250	2.0
0.321	0.9
0.321	0.7
Средняя	
0.399 ± 0.051	2.8 ± 1.0

Таблица 3
Содержание серотонина
в экстрактах тканей *P. integerrimum* (метод Юденфренда,
1965)

мкг/г сырого веса тканей	нг на 1 паразита
0.139	1.3
0.161	1.2
0.104	0.8
0.084	0.7
0.184	1.5
0.266	2.2
0.285	1.6
0.373	3.6
Средняя	
0.199 ± 0.037	1.6 ± 0.32

Таблица 2
Содержание дофамина в передних и задних фрагментах
P. integerrimum

	мкг/г сырого веса тканей	нг на 1 паразита
Передний фрагмент	0.296—0.356 (2)	0.8—1.0
Задний фрагмент	0.134—0.395 (2)	0.3—1.0

Примечание. Цифры в скобках — число экспериментов.

гельминтов, обработанных в соответствии с применяемыми методиками концентрированной соляной кислотой или ортофталевым альдегидом, были идентичны спектральным характеристикам стандартного раствора серотонина, обработанного таким же образом, что и ткань гельминтов (рис. 2, 3). В табл. 3 представлены количественные данные о содержании вещества, определенного при измерении флуоресценции после добавления концентрированной соляной кислоты. Концентрация выявленного вещества составляет 0.08—0.37 мкг/г ткани (1.2—3.6 нг на 1 паразита). Следует отметить, что при использовании ортофталевого альдегида (метод Maickel e. a., 1968) значения концентрации определяемого вещества оказались несколько большими по сравнению с результатами, полученными с применением концентрированной соляной кислоты (метод Юденфренда, 1965), что, вероятно, связано с наличием в экстрактах тканей другого (или других) веществ, флуоресцирующих при обработке ортофталевым альдегидом. Определение серотонина в гомогенатах тканей передних и задних фрагментов тела паразита не выявило различий в содержании вещества.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный спекtroфлуориметрический анализ показал наличие в экстрактах тканей полистом дофамина. Эти данные находятся в соответствии с результатами гистохимических исследований, выявивших флуоресценцию, характерную для катехоламинов в некоторых нейронах, волокнах мозга и нервных стволов *P. integerrimum* (Шишов и др., 1982) и свидетельствуют о том, что одним из вероятных медиаторов нервной системы у представителя моногеней, по-видимому, является дофамин. Как известно, дофамин обнаружен у всех изученных в настоящее время trematod и ряда цестод (Теренина, 1981, 1982;

Chou e. a., 1972; Gianutsos, Bennett, 1977; Terenina, 1984, и др.). Предполагают, что дофамин, помимо медиаторной роли, может выполнять и иные функции, связанные, в частности, с процессом образования оболочки яиц у плоских червей (Gianutsos, Bennett, 1977; Теренина, 1981, 1982; Теренина, 1984). Тот факт, что количественное содержание дофамина у полистом в передних фрагментах тела, т. е. в области наибольшего скопления нервных структур, существенно не отличается от такового в задней части тела, дает основание предположить, что функция этого вещества у моногеней может также не ограничиваться только медиаторной ролью.

Полученные результаты показали, что наряду с дофамином в гомогенатах тканей полистом присутствует серотонин или близкое ему вещество. Среди других представителей плоских червей серотонин выявлен гистохимически и иммуноцитохимически в нервной системе цестод и отдельных нервных элементах trematod (Bennett, Bueding, 1971; Lee e. a., 1978; Gustafsson e. a., 1985, и др.). Имеются данные о наличии серотонина в экстрактах тканей этих паразитов (Terenina, 1984; Bennett e. a., 1969; Chou e. a., 1972; Hariri, 1974, и др.). Количественное содержание серотонина у полистом по сравнению с концентрацией вещества у большинства исследованных цестод или некоторых trematod (например, у шистосом) относительно невелико. Полученные нами данные о наличии серотонина в гомогенатах тканей *P. integrerrimum*, а также недавно появившиеся в литературе сведения о локализации серотонина в нервной системе *Diclidophora merlangi* (Halton e. a., 1986) делают вероятным предположение, что серотонин у моногеней может играть медиаторную роль.

Л и т е р а т у р а

Манухин Б. Н., Бердышева Л. В., Волина Е. В. Одновременное определение катехоламинов и серотонина после их очистки на ионообменной смоле. — Вопр. мед. химии, 1975, т. 21, вып. 3, с. 317—321.

Теренина Н. Б. Идентификация катехоламинов в тканевых экстрактах trematodes *Fasciola hepatica*. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1981, т. 17, № 4, с. 342—347.

Теренина Н. Б. Биогенные амины (дофамин, серотонин) в тканях некоторых trematod сем. Plagiorchidae — Паразитология, 1982, т. 16, вып. 5, с. 384—389.

Узбеков М. Г. Содержание серотонина и активность триптофан-5-гидроксилазы в зрительной системе мозга крыс в онтогенезе. — Онтогенез, 1981, т. 12, № 1, с. 58—65.

Шишов Б. А., Теренина Н. Б., Люксина Л. М. Катехоламины — вероятные медиаторы в элементах нервной системы моногеней и trematod. — В кн.: 8-е совещ. по эволюц. физиол. Л., 1982, с. 338.

Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., Мир, 1965. 484 с.

Bennett J., Bueding E., Timms A. R., Engstrom R. G. Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. — Molec. Pharmacol., 1969, vol. 5, N 5, p. 542—545.

Bennett J., Bueding E. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. — Comp. Biochem. Physiol., 1971, vol. 39A, N 4, p. 859—867.

Carlsson A., Waldbeck B. A fluorometric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). — Acta physiol. scand., 1958, vol. 44, p. 293—298.

Chou T. C. T., Bennett J., Bueding E. Occurrence and concentrations of biogenic amines in trematodes. — J. Parasitol., 1972, vol. 58, N 6, p. 1098—1102.

Gianutsos G., Bennett J. L. The regional distribution of dopamine and norepinephrine in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. — Comp. Biochem. Physiol., 1977, vol. 58 C, N 2, p. 157—159.

Gustafsson M. K. S., Wikgren M. C., Karhi T. J., Schot L. P. S. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*. — Cell Tissue Res., 1985, vol. 240, p. 255—260.

Нагри М. Occurrence and concentration of biogenic amines in *Mesocestoides corti* (Cestoda). — J. Parasitol., 1974, vol. 60, N 5, p. 737—743.

Halton D. W., Maule A. G., Johnston C. F., Fairweather J. Coexistence of acetylcholine (Ach) and serotonin (5-HT) as putative neurotransmitters in the nerves of a fish-gill parasite, *Diclidophora merlangi*. — Proc. Roy. Microsc. Soc., 1986, vol. 21, N 6, Suppl., p. 29—30.

Lee M. B., Bueding E., Schiller E. L. The occurrence and distribution of 5-hydroxytryptamine in *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*. — J. Parasitol., 1978, vol. 64, N 2, p. 257—264.

Maickel R. P., Cox R. H., Saillant J., Miller F. P. A method for the determination

of serotonin and norepinephrine in discrete areas of rat brain. — Int. J. Neuropharmacol., 1968, vol. 7, p. 275—281.

Shaw K. The fine structure of the brain of *Gastrocotyle trachuri* (Monogenea: Platyhelminthes). — Cell and Tissue Res., 1982, vol. 226, N 2, p. 449—460.

Terenina N. B. Results of spectrofluorimetric determination of biogenic amines (serotonin, dopamine) in cestodes. — Helminthologia, 1984, vol. 21, N 4, p. 275—280.

ГЕЛАН СССР, Москва

Поступила 28.08.1986

SEROTONIN, DOPHAMINE IN EXTRACTS FROM TISSUES
OF POLYSTOMA INTEGERRIMUM (MONOGENEA)

N. B. Terenina, E. B. Overchuk

S U M M A R Y

Spectrophluometric analysis has revealed substances with spectral characteristics identical to these of serotonin and dopamine in tissue extracts of *Polystoma integerrimum*. A possible function of the substances is discussed.
